

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 20 août 1999 (20.08.99)	
Demande internationale no PCT/FR98/02320	Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/CA 59.197
Date du dépôt international (jour/mois/année) 29 octobre 1998 (29.10.98)	Date de priorité (jour/mois/année) 30 octobre 1997 (30.10.97)
Déposant GABERT, Jean	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

15 mai 1999 (15.05.99)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé R. Forax no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/FE 59197-882	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR98/02320	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29/10/1998	Date de priorité (jour/mois/année) 30/10/1997
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68		
Déposant GABERT, Jean		



1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 9 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 6 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 15/05/1999	Date d'achèvement du présent rapport 25. 01. 00
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Renggli, J  N° de téléphone +49 89 2399 7461

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02320

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées, dans le présent rapport, comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.*) :

Description, pages:

1-27 version initiale

3a reçue(s) le 12/11/1999 avec la lettre du 09/11/1999

Revendications, N°:

1-15 reçue(s) le 12/11/1999 avec la lettre du 09/11/1999

Dessins, feuilles:

1/1 version initiale

2. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

3. ☒ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

voir feuille séparée

4. Observations complémentaires, le cas échéant :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRELIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR98/02320

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications 13-15
Activité inventive	Oui : Revendications 1-12
	Non : Revendications 13-15
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-15
	Non : Revendications

2. Citations et explications

voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

voir feuille séparée

Section I:

Le demandeur a supprimé la caractéristique suivante dans la revendication 7:

"marqués", voir revendication 7, page 2, ligne 30

Cette caractéristique est cependant présentée comme essentielle dans la divulgation de l'invention eu égard au problème technique que celle-ci se propose de résoudre.

En effet, la revendication 8 version initiale, de même que la description de la présente demande décrivent uniquement des produits de PCR marqués lorsque ceux-ci sont utilisés en combinaison avec une pluralité de sondes sur un support miniaturisé.

La suppression de cette caractéristique conduit donc à étendre l'objet de la demande au delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée, puisque de nouvelles combinaisons sondes-produits de PCR sont ainsi divulguées. Elle va par conséquent à l'encontre des dispositions de l'article 34(2) b) PCT.

Le présent rapport d'examen préliminaire international a été rédigé en considérant que ladite caractéristique n'avait pas été supprimée par le demandeur.

Section V:

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 Barr et al., Am. J. Clin. Path., 1995, 104, pp. 627-633
- D2 US 5 024 934
- D3 Akasaka et al., Blood, 1996, 88, pp. 985-994
- D4 Peter M. et al., Int. J. Cancer, 1996, 67, pp. 339-342
- D5 WO96/13514
- D6 Ratech et al., Am. J. Clin. Pathol., 1993, 100, pp. 527-533
- D7 Kehrer-Sawatzki et al., Human Genetics, 1997, 99, pp. 237-247

D8 Corral et al., PNAS, 1993, 90, pp. 8538-8542

2. Application industrielle:

Le contenu des revendications 1-15 est susceptible d'application industrielle.

3. Nouveauté:

Le document **D1** décrit une méthode RT-PCR ou RT-PCR/hybridation qui permet de différencier des sous-types de translocations chromosomiques (TC) associées à certains types de sarcomes. Les cDNA des translocations PAX3-FKHR et PAX7-FKHR associées au "alveolar rhabdomyosarcoma" sont co-amplifiés à l'aide d'amorces communes sélectionnées pour leur homologie avec PAX3/PAX7 et optionnellement différenciées à l'aide de sondes spécifiques pour respectivement, PAX3, PAX7 et FKHR (cf. page 627, 2e colonne; page 628, table 1; page 630, fig. 2; page 631, fig. 4). Un autre type de translocations, mis en évidence selon la même stratégie, est également étudié dans D1; il s'agit des translocations EWS-FLI1 et EWS-ERG qui sont associées au sarcome d'Ewing. Les essais développés permettent de différencier les types de tumeurs entre eux (cf. page 630, fig. 2; page 631, fig. 4).

D2-D4 décrivent des méthodes similaires impliquant l'emploi d'amorces spécifiques:

D2 décrit une méthode par PCR permettant la détection de TC impliquant les chromosomes 14 et 18 et associés à certains cancers leucocytaires (cf. D2, colonne 2). Les amorces sont spécifiques respectivement du chromosome 14 et 18, au voisinage du point de rupture. La présence de séquences amplifiées est révélé par l'ajout de sondes spécifiques (cf. revendications 1 et 2).

D3 décrit une méthode pour la détection de TC de leucémies, utilisant une enzyme PCR permettant de produire des fragments de grandes longueurs à partir d'ADN génomique, détectés à l'aide de sondes spécifiques (cf. D3, résumé; table 1, page 987; fig. 2, page 988).

D4 s'intéresse aux TC EWS/ERG associées aux tumeurs d'Ewing et plus particulièrement, à une forme particulière tronquée des dites TC. Les TC sont amplifiées par PCR à partir de cDNA ou DNA génomique, ceci à l'aide de différentes amorces spécifiques pour différentes parties des gènes fusionnés (cf. D4, page 339, résumé et matériels et méthodes; page 340, table 1 et fig. 2; page 341, discussion).

Le contenu de la revendication 1 semble donc nouveau, car D1-D4 décrivent des méthodes de détection de remaniements génétiques par PCR effectuées avec des amorces spécifiques pour les deux partenaires du remaniement. La caractéristique technique "amorce aléatoire" différencie donc la revendication 1 de la présente demande par rapport à D1-D4 (Art. 33(2) PCT). Les revendications 2-10 et les applications des revendications 11 et 12 sont donc nouvelles. Ces documents ne décrivent pas de trousse de diagnostic et les revendications 13-15 sont donc nouvelles par rapport à D1-D4 (Art. 33(2) PCT).

D5 a pour objet l'étude du gène TCL-1 en association avec tumeurs de la lignée myéloïde. La présence d'anomalies chromosomiques au niveau du locus TCL-1 et la surexpression de la protéine TCL-1 sont associés à certains cancers leucémiques (cf. D5, page 2, lignes 13-35). D5 fournit donc des méthodes permettant de détecter ces différents phénomènes, à l'aide d'anticorps, de sondes ou de méthodes d'amplification par PCR (cf. D5, page 9, lignes 6-17). L'amplification PCR (génomique ou cDNA) est effectuée à l'aide de primers de 8-25 nucléotides pouvant être spécifiques ou dégénérés (cf. page 13, lignes 6-37; page 17, lignes 34-37; page 62-suiv., section 7.2.2) et la région amplifiée peut être révélée selon des techniques standards d'hybridation (cf. page 15, lignes 1-7; page 30, ligne 28-page 31, lignes 9). D5 décrit également des applications (cf. page 33-suiv., section 5.8.1) sous forme de kits diagnostiques, pouvant comporter des sondes marquées et/ou immobilisées (cf. page 39-page 40, ligne 11; revendications 44-45). L'argument présenté par le demandeur selon lequel D5 utilise des amorces non-aléatoires mais dégénérées est accepté. Les revendications 1-12 sont donc nouvelles par rapport à D5 (Art. 33(2) PCT). Le document D5 (cf. D5, page 38, ligne 18-page 40, ligne 11; page 43, ligne 32-page 44) expose par contre toutes les caractéristiques des revendications 13-15 de la présente demande qui ne sont donc pas nouvelles comme requis par l'article

33(2) PCT et Directives III-4.8 PCT.

Le document **D6** décrit une méthode de PCR ancrée permettant la détection large de diverses TC associées au néoplasies de cellules B (cf. page 527, 2e colonne; page 528, fig. 1; page 529, table 1; page 530, 1ère colonne, results)). Les séquences amplifiées par RT-PCR sont effectivement détectées par clonage et séquençage, comme indiqué par le demandeur (cf. page 528, fig. 1). D6 suggère également l'emploi de kits (cf. page 532, 2e colonne, 5e paragraphe). Le demandeur a commenté ce document dans son courrier du 9.11.1999 en indiquant que: "Toutefois, les amorces décrites sont spécifiques des IgH, alors que les amorces utilisées dans l'invention sont aléatoires et ne présentent donc aucune spécificité". Cette dernière analyse de D6 est partagée, car D6 décrit l'emploi d'une séquence spécifique pour IgH en combinaison avec un séquence "adapter" pour polyA cDNA (cf. D6, page 528, Fig. 1 et page 529, table 1) qui permet l'amplification d'un large spectre de TC associées au néoplasies de cellules B matures. Cette technique ne comporte donc apparemment pas (i) d' amorces aléatoires et ne comprend pas (ii) une étape de révélation appliqué au produit de PCR qui est réalisée à l'aide de marqueurs spécifiques des remaniements. Le document D6 n' anticipe donc pas le contenu de la revendication 1, des revendications dépendantes 2-10 et des applications objet des revendications 11 et 12. Par contre, D6 dévoile toutes les caractéristiques du kit de la revendication 13 qui n'est donc pas nouvelle (Art. 33(2) PCT et Directives III-4.8 PCT). Les caractéristiques supplémentaires des revendications 14 et 15 ne sont pas décrites dans D6 et ces revendications sont donc nouvelles par rapport à D6.

D7 a pour but la détermination de la séquence associée à la TC t(17:22). Cette translocation est présente chez les patients atteints de neurofibromatose de type 1 (cf. D7, résumé). Une PCR semi-spécifique de l'ADN génomique est employée dans ce but (cf. page 239, "polymerase chain reaction analysis" et table 1); cette PCR est basée sur l'emploi d'ADN génomique polyA et de primers polyT correspondants qui sont utilisés pour pré-amplifier la région d'intérêt. Les produits PCR sont ensuite clonés, séquencés et comparés (cf. page 241, fig. 3). Pour les mêmes raisons que D6 en combinaison avec la revendication 1, D7 ne porte donc pas préjudice à la nouveauté de la revendication 1 et des revendications 2-12. De plus, ce document ne décrit pas de trousse de diagnostic et les revendications

13-15 sont donc nouvelles par rapport à D7 (Art. 33(2) PCT).

D8 décrit une méthode de PCR ancrée permettant la détection large de diverses TC du gène MLL associées aux leucémies. Ce document décrit l'emploi d'une PCR ancrée basée sur l'emploi de primers connus (cf. page 8539, 1ère colonne); les produits d'amplification sont détectés par séquençage (cf. page 8541, "The AFX1 gene encodes..."). Pour les mêmes raisons que D6 et D7, les revendications 1-12 de la présente demande sont donc nouvelles par rapport à D8 (Art. 33(2) PCT). De plus, ce document ne décrit pas de trousse de diagnostic et les revendications 13-15 sont donc nouvelles par rapport à D8 (Art. 33(2) PCT).

4. **Activité inventive:**

Le document D8 (cf. analyse ci-dessus et description de la présente demande, page 10, lignes 26-27), qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit une méthode permettant d'identifier de façon large des TC dont diffère celle qui fait l'objet de la revendication 1 en ce que (i) une amorce aléatoire est utilisée dans la PCR asymétrique et en ce que (ii) la détection est appliquée au produit PCR et effectuée à l'aide de marqueurs spécifiques des remaniements géniques.

Le problème résolu par la revendication 1 par rapport à D8 (séquençage) peut donc être considéré comme la mise au point d'une méthode plus pratique permettant la détection d'un grand nombre de TC.

La solution consiste en l'utilisation combinée de l'amorce aléatoire et de l'étape de détection appliquée au produit PCR et effectuée à l'aide de marqueurs spécifiques des remaniements géniques. Cette solution n'est pas suggérée dans l'art antérieur et est donc inventive comme requis par l'article 33(3) PCT. Il s'ensuit que les revendications 2-12 sont également inventives (pour la revendication 8, voir également Section VIII, point 1.).

5. Cet examen est fondé sur l'hypothèse que toutes les revendications jouissent d'un droit de priorité datant du dépôt du document de priorité. S'il s'avérait qu'il n'en

était pas ainsi, le document P (Gabert et al., Blood, 90, 1997, page 500a) cité dans le rapport de recherche internationale pourrait devenir pertinent.

Section VIII

1. Suite aux objections soulevées dans l'Opinion Ecrite, le demandeur a modifié la revendication 1 afin de clarifier sur quel matériel l'amorce aléatoire est utilisée, soit sur l'ADN et l'ADNc. Cette clarification introduit une contradiction avec la revendication 8 qui indique que l'amorce aléatoire utilisée dans "une PCR ancrée" est complémentaire à une portion de la cassette utilisé pour produire l'ADNc (Art. 6 PCT). Il n'est pas clair comment une amorce aléatoire peut dans le même temps être complémentaire d'une séquence connue. De même, et comme déjà indiqué dans l'Opinion Ecrite, les étapes composant la revendication 8 ne sont toujours pas claires, car le lien unissant ces étapes à celles de la revendication 1 (Directives III-4.1 et 4.4 PCT) n'est pas clairement établi (Art. 6 PCT).
2. Certaines caractéristiques énoncées dans la revendication de trousse de diagnostic 13 servent plus à expliciter le mode d'utilisation du dispositif qu'à définir clairement le dispositif en termes de caractéristiques techniques. Les limitations que l'on entend signifier par ces caractéristiques ne ressortent donc pas clairement de cette revendication, contrairement à ce qui est exigé à l'article 6 PCT.
3. Les termes "tel/telles que" et "en outre", utilisés dans les revendications 13 et 15 sont vagues et équivoques, et laissent un doute quant à la signification des caractéristiques techniques auxquelles ils se réfèrent. L'objet desdites revendications n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT et directives III-4.6 PCT).
4. La caractéristique de la revendication 2, selon laquelle Tm est de l'ordre de 75-85 °C, n'est pas mentionnée dans la description. La revendication 2 ne se fonde donc pas sur la description, comme l'exige l'article 6 PCT.

Dans WO 96/13514, on décrit la caractérisation et l'isolement du gène *TCL-1* associé à des anomalies.

Ce document vise à caractériser tous les gènes de la même famille *TCL-1* et utilise à cet effet une technique PCR avec
5 mise en oeuvre d'amorces dégénérées.

Dans J.Clin, Pathol, 1993, 100, p 527-533, Ratech et al rapportent l'intérêt d'une PCR ancrée pour détecter un large spectre de néoplasies de cellules B matures. Les amorces décrites sont spécifiques des IgH et ne sont donc pas
10 totalement aléatoires. De plus, les produits de PCR obtenus sont clonés et séquencés, ce qui correspond à des techniques de caractérisation lourdes à mettre en oeuvre.

Dans Human genetics, 1997, 99, p 237-247, Kehrer - Sawatzki et al analysent des régions de cassure dans la gène
15 *NF1* impliqué dans la neurofibromatose de type 1.

La technique PCR dite semi-spécifique mise en oeuvre est réalisée de manière à identifier le fragment de jonction dans la région de cassure, sa séquence étant ensuite analysée. Cet article n'enseigne donc pas d'amplification asymétrique pour
20 amplifier l'ensemble des gènes de fusion et de révélation des seuls gènes impliqués dans le remaniement.

Dans PNAS, 1993, 90, p 8538-8542, Corral et al étudient la cassure dans MLL de différentes translocations et de délétions de 11q, avec clonage de certains partenaires du gène
25 MLL aux fins d'identification, ce qui correspond à une technique utilisable en recherche, mais lourde à appliquer en opération de routine.

REVENDEICATIONS

1/ Méthode de diagnostic in vitro de pathologies associées à des remaniements géniques, dans laquelle on soumet
5 l'ADN ou l'ADNc d'un patient à une étape de PCR ancrée, caractérisée en ce qu'elle comprend, en association,

- une ou plusieurs étapes de PCR asymétrique, réalisées de manière non spécifique des remaniements géniques, en utilisant un seul couple d'amorces formé par une amorce
10 spécifique de la séquence nucléotidique correspondant au gène susceptible d'être impliqué dans un gène de fusion et par une amorce aléatoire, et

- une étape de révélation appliquée au produit de la PCR, réalisée à l'aide de marqueurs spécifiques des remaniements
15 géniques, afin de ne révéler que les gènes impliqués dans un remaniement, et ce dans leur totalité.

2/ Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que les amorces utilisées dans l'étape d'amplification
20 comportent 25 à 40 nucléotides et T_m est de 75 à 85°C.

3/ Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les produits PCR sont marqués en vue de l'étape de révélation et dénaturés, puis mis en contact avec des sondes
25 spécifiques des séquences nucléotidiques des partenaires de fusion.

4/ Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que les sondes sont fixées sur un support de manière
30 covalente.

5/ Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les produits de PCR sont dénaturés et mis en contact avec des sondes marquées en solution.

5 6/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que pour l'obtention de l'ADNc on utilise comme amorces des séquences comprenant une cassette de 40 à 60 nucléotides et à l'une des extrémités de 10 à 20 motifs T ou une répétition d'un motif nucléotidique au hasard,
10 avec un T_m de 80 à 90°C.

7/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- on soumet l'ADN génomique, ou l'ARN, extraits des
15 cellules de l'échantillon à étudier, à l'action d'un composé capable d'inciser ou de bloquer spécifiquement l'ADN ou l'ARN du gène dont on étudie la fusion,

- on effectue la ou les étapes de PCR et on fait réagir les produits obtenus avec d'une part deux sondes spécifiques
20 du gène à étudier, une en amont de la région des points de cassure et une en aval, d'autre part des sondes élaborées à partir des gènes partenaires connus,
une détection positive avec la sonde d'amont et négative avec la sonde d'aval dans le premier cas permettant de conclure au
25 réarrangement du gène considéré, et une conclusion négative dans le deuxième cas, à l'absence de détection d'un produit de fusion connu, ou qu'en variante,

- on fait réagir les produits de PCR avec une pluralité de sondes sur un support miniaturisé, l'hybridation spécifique
30 sonde-produits de PCR, mettant en évidence le partenaire du gène de fusion.

8/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection de translocations impliquant le gène MLL et comprend,

- la synthèse par RT d'un pool d'ADNc à partir de l'ARN
5 extrait de l'échantillon à étudier, à l'aide d'amorces comportant une cassette de 30 à 35 nucléotides complétée par une séquence de 6 ou 9 motifs nucléotidiques au hasard,
- la réalisation d'une PCR ancrée avec, avec comme amorce sens spécifique, une amorce située sur l'exon 5 de MLL, suivie
10 le cas échéant,
- d'un deuxième tour d'amplification, avec utilisation d'une amorce sens interne par rapport à la première, l'amorce aléatoire étant à chaque tour la même et complémentaire de la cassette d'oligonucléotides utilisée dans l'étape de RT.

15

9/ Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que la révélation des transcrits de fusion éventuellement présents comprend la mise en contact

- d'une sonde spécifique des partenaires de fusion connus
20 de MLL avec les produits de PCR dénaturés, marqués par de la digoxygénine lors de l'amplification, dans des conditions permettant une hybridation lorsqu'il existe une complémentarité de bases,
- des produits résultants avec des anticorps anti-digoxygénine, ces anticorps étant couplés à une enzyme,
25 capable de réagir avec son substrat en libérant un produit coloré détectable dans le cas où les anticorps sont fixés aux produits de PCR, puis
- du mélange réactionnel sondes/produits de PCR avec le
30 substrat de l'enzyme,
le produit éventuellement formé étant alors détecté.

10/ Méthode selon la revendication 8 ou 9, caractérisée en ce que pour détecter de nouvelles associations MLL-gène partenaire, on soumet les ARN totaux extraits du patient à l'action de ribozymes spécifiques du gène MLL avant de
5 procéder à la RT-PCR, puis on fait réagir les produits d'amplification d'une part avec une sonde correspondant à une séquence de l'exon 5 de MLL, en 3' de l'amorce utilisée, puis avec une deuxième sonde toujours spécifique du gène MLL, située entre les points de cassure et le site d'action des
10 ribozymes, et enfin avec des sondes de partenaires connus.

11/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, au diagnostic de leucémies.

15 12/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, au diagnostic de tumeurs solides, telles que les tumeurs d'Ewing.

20 13/ Trousses de diagnostic pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisées en ce qu'elles comportent les réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR et du test de révélation, et le cas échéant de la transcription inverse et/ou de la réaction avec des agents capables d'inciser ou de
25 bloquer le gène tels les PNA ou les ribozymes, ces troussees comportant en outre les amorces pour ces différentes réactions et les solvants ou tampons appropriés pour leur réalisation.

30 14/ Trousses selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles comprennent comme agents capables d'inciser ou de

bloquer le gène des acides nucléiques polypeptidiques ou des ribozymes.

15/ Trousses selon la revendication 13 ou 14,
5 caractérisées en ce qu'elles comportent des sondes
oligonucléotidiques pour réaliser les hybridations mises en
oeuvre lors de l'étape de révélation; ces sondes étant fixées
sur un support tel qu'une plaque à multipuits, et sont telles
qu'obtenues par couplage d'un réactif qu'elles comportent à
10 l'une de leurs extrémités avec un réactif de la plaque, ou
qu'en variante les sondes oligonucléotidiques sont fixées sur
un support miniaturisé ou, selon encore une autre variante,
les sondes internes sont fixées sur des bandelettes.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/CA 59.197	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 98/ 02320	Date du dépôt international (jour/mois/année) 29/10/1998	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 30/10/1997
Déposant GABERT, Jean		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

- ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
- ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence
 - ☒ déposé avec la demande internationale
 - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
 - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
 - ☐ transcrit par l'administration
- En ce qui concerne le titre. ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:
- En ce qui concerne l'abrégé,
 - ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
 - ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.
- La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:
 Figure n° ☐ suggérée par le déposant.
☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARR F G ET AL.: "A consensus polymerase chain reaction - oligonucleotide hybridization approach for the detection of chromosomal translocations in pediatric bone and soft tissue sarcomas" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, vol. 104, 1995, pages 627-633, XP002071719 voir le document en entier ---	1-7, 13
X	US 5 024 934 A (LEE MING-SHENG) 18 juin 1991 voir abrégé voir colonne 1, ligne 62 - colonne 2, ligne 63 voir colonne 4, ligne 6 - ligne 16; revendications 1,3,5-7,10-14,18,19,23 --- -/--	1,3-6,12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 février 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

CABINET

ARMENGAUD AINÉ

3, avenue Bugeaud, 75116 PARIS

09/530363
527 Rec'd PCT/PTO 28 APR 2000

CERTIFICATE OF TRANSLATION

I, Chantal PEAUCELLE, European Patent Attorney, 3 Avenue Bugeaud - 75116
PARIS FRANCE,

hereby state :

THAT I am well acquainted with the French and English languages.

THAT the attached English translation is a true and correct translation of PCT Patent
Application n° PCT/FR98/02320

to the best of my knowledge and belief.



Chantal PEAUCELLE

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference CP/FE 59197-882	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR98/02320	International filing date (day/month/year) 29 October 1998 (29.10.98)	Priority date (day/month/year) 30 October 1997 (30.10.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant GABERT, Jean		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 15 May 1999 (15.05.99)	Date of completion of this report 25 January 2000 (25.01.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR98/02320

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-27, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages 3a, filed with the letter of 09 November 1999 (09.11.1999),
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-15, filed with the letter of 09 November 1999 (09.11.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See the Supplemental Box.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

I.3

The Applicant has deleted the following feature from claim 7:

"marked" (see claim 7, page 2, line 30).

However, this feature is described as being essential in the disclosure of the invention, in view of the technical problem the invention is intended to solve.

Indeed, the original version of claim 8 as well as the description of the present application only describe marked PCR products when these products are used in combination with a plurality of probes on a miniature carrier.

Therefore, deleting said feature causes the subject matter of the application to be extended beyond the content of the application as filed, since new combinations of probes and PCR products are thus disclosed. It follows that it fails to comply with the provision of PCT Article 34(2)(b).

The present international preliminary examination report has been drawn up as if said feature has not been deleted by the Applicant.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02320

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-12	YES
	Claims	13-15	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12	YES
	Claims	13-15	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-15	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The following documents are referred to herein:

D1: Barr et al., J. Clin. Path., 1995, 104, pp. 627-633

D2: US 5 024 934

D3: Akasaka et al., Blood, 1996, 88, pp. 985-994

D4: Peter M. et al., Int. J. Cancer, 1996, 67, pp. 339-342

D5: WO 96/13514

D6: Ratech et al., Am. J. Clin. Pathol., 1993, 100, pp. 527-533

D7: Kehrer-Sawatzki et al., Human Genetics, 1997, 99, pp. 237-247

D8: Corral et al., PNAS, 1993, 90, pp. 8538-8542

2. Industrial applicability:

The content of claims 1-15 is industrially applicable.

3. Novelty:

Document **D1** describes an RT-PCR or RT-PCR/hybridisation method enabling differentiation of

subtypes of chromosomal translocations (CTs) associated with certain types of sarcoma. The cDNAs of translocations PAX3-FKHR and PAX7-FKHR associated with "alveolar rhabdomyosarcoma" are co-amplified using common primers selected for their homology with PAX3/PAX7 and optionally differentiated by means of probes specific to PAX3, PAX7 and FKHR, respectively (cf. page 627, second column; page 628, table 1; page 630, figure 2; page 631, figure 4). Another type of translocation revealed by the same strategy and also studied in D1 is translocations EWS-FLI1 and EWS-ERG, which are associated with Ewing's sarcoma. The tests developed enable the types of tumour to be mutually differentiated (cf. page 630, figure 2; page 631, figure 4).

D2-D4 describe similar methods involving the use of specific primers:

D2 describes a PCR method enabling the detection of CTs involving chromosomes 14 and 18 and associated with certain leukocyte cancers (cf. D2, column 2). The primers are specific to chromosomes 14 and 18, respectively, adjacent to the breaking point. The presence of amplified sequences is revealed by the addition of specific probes (cf. claims 1 and 2).

D3 describes a method for detecting leukaemia CTs using a PCR enzyme to produce long fragments from genomic DNA, detected by means of specific probes (cf. D3, abstract; table 1, page 987; figure 2, page 988).

D4 relates to EWS/ERG CTs associated with Ewing tumours and, specifically, a special truncated form

of said CTs. The CTs are amplified by PCR from cDNA or genomic DNA, using various primers specific to various parts of the fused genes (cf. D4, page 339, abstract and materials and methods; page 340, table 1 and figure 2; page 341, discussion).

Therefore, the content of claim 1 appears to be novel, since D1-D4 describe methods for detecting genetic PCR rearrangements carried out with primers specific to both of the rearrangement partners. It follows that the technical feature "random primer" differentiates claim 1 of the present application from D1-D4 (PCT Article 33(2)). Claims 2-10 and the uses of claims 11 and 12 are thus novel. Since said documents do not describe diagnostic kits, claims 13-15 are novel over D1-D4 (PCT Article 33(2)).

D5 relates to the study of gene TCL-1 in association with myeloid lineage tumours. The presence of chromosomal abnormalities at the TCL-1 locus and the overexpression of the TCL-1 protein are associated with certain leukaemic cancers (cf. D5, page 2, lines 13-35). Therefore, D5 provides methods for detecting such phenomena using antibodies, probes or PCR amplification methods (cf. D5, page 9, lines 6-17). (Genomic or cDNA) PCR amplification is carried out using primers that have 8-25 nucleotides and may be specific or degenerate (cf. page 13, lines 6-37; page 17, lines 34-37; page 62 onwards, section 7.2.2) and the amplified region may be revealed by standard hybridisation techniques (cf. page 15, lines 1-7; page 30, line 28 to page 31, line 9). D5 also describes uses (cf. page 33 onwards, section 5.8.1) as diagnostic kits optionally comprising marked and/or immobilised probes (cf., page 39 to

page 40, line 11; claims 44 and 45). The Applicant's argument to the effect that D5 uses primers that are non-random but degenerate is accepted. Therefore, claims 1-12 are novel over D5 (PCT Article 33(2)). However, document D5 (cf. D5, page 38, line 18 to page 40, line 11; page 43, line 32 to page 44) discloses all of the features of claims 13-15 of the present application, which thus lack the novelty required by PCT Article 33(2) and the PCT Guidelines, III, 4.8.

Document **D6** describes an anchored PCR method enabling the broad detection of various CTs associated with B cell neoplasias (cf. page 527, second column; page 528, figure 1; page 529, table 1; page 530, first column, results). The sequences amplified by RT-PCR are indeed detected by cloning and sequencing, as indicated by the Applicant (cf. page 528, figure 1). D6 also suggests the use of kits (cf. page 532, second column, fifth paragraph). This document is discussed in the Applicant's letter of 9.11.1999, in which it is indicated that "However, the primers described are specific to IgH, whereas the primers used in the invention are random and thus do not have any specificity". This analysis of D6 is correct, since D6 describes the use of a sequence specific to IgH in combination with an "adapter" sequence for polyA cDNA (cf. D6, page 528, figure 1 and page 529, table 1) enabling the amplification of a broad spectrum of CTs associated with mature B cell neoplasias. Therefore, this technique does not appear to comprise (i) random primers and does not include (ii) a step of revealing the PCR product carried out by means of markers specific to the rearrangements. It follows

that document D6 does not anticipate the content of claim 1, dependent claims 2-10 and the uses forming the subject matter of claims 11 and 12. However, D6 discloses all of the features of the kit of claim 13, which thus lacks novelty (PCT Article 33(2) and the PCT Guidelines, III, 4.8). The additional features in claims 14 and 15 are not described in D6, meaning that said claims are also novel over D6.

D7 relates to the determination of the sequence associated with CT t(17:22). This translocation is present in patients with type 1 neurofibromatosis (cf. D7, abstract). A PCR semi-specific to genomic DNA is used for this purpose (cf. page 239, "polymerase chain reaction analysis" and table 1). This PCR is based on the use of polyA genomic DNA and corresponding polyT primers that are used to pre-amplify the region of interest. The PCR products are then cloned, sequenced and compared (cf. page 241, figure 3). Therefore, for the same reasons as with D6 in combination with claim 1, D7 does not deprive claim 1 and claims 2-12 of novelty. Furthermore, D7 does not describe diagnostic kits and claims 13-15 are thus novel over D7 (PCT Article 33(2)).

D8 describes an anchored PCR method enabling the broad detection of various MLL gene CTs associated with leukaemias. This document describes the use of anchored PCR based on the use of known primers (cf. page 8539, first column). The amplification products are detected by sequencing (cf. page 8541, "The AFX1 gene encodes ..."). Therefore, for the same reasons as with D6 and D7, claims 1-12 of the present application are novel over D8 (PCT Article 33(2)).

Furthermore, D8 does not describe diagnostic kits and claims 13-15 are thus novel over D8 (PCT Article 33(2)).

4. Inventive step:

Document D8 (cf. the above discussion and page 10, lines 26-27 of the description of the present application), which is considered to be the closest prior art, describes a method enabling the broad identification of CTs, from which the method forming the subject matter of claim 1 differs in that (i) a random primer is used in the asymmetrical PCR, and in that (ii) detection is applied to the PCR product and carried out by means of markers specific to the gene rearrangements.

The problem solved by claim 1 relative to D8 (sequencing) may thus be considered to be that of developing a more practical method for detecting a large number of CTs.

The solution comprises the combined use of the random primer and the detection step applied to the PCR product and carried out by means of markers specific to the gene rearrangements. This solution is not suggested in the prior art and is, therefore, inventive (PCT Article 33(3)). It follows that claims 2-12 are also inventive (regarding claim 8, see also Box VIII, point 1).

5. The present examination is based on the assumption that all of the claims enjoy a right of priority as of the filing date of the priority document. Should this later prove not to be the case, the P document

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02320

(Gabert et al., Blood, 1997, page 500a) cited in the international search report might become relevant.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. In response to the objections raised in the Written Opinion, the Applicant has amended claim 1 in an attempt to clarify the material on which the random primer is used, i.e. either DNA or cDNA. This clarification renders claim 1 inconsistent with claim 8, which indicates that the random primer used in "an anchored PCR" is complementary to a portion of the cassette used to produce the cDNA (PCT Article 6). It is not clear how a random primer can at the same time be complementary to a known sequence. Similarly, as already indicated in the Written Opinion, the steps of claim 8 are still unclear, since the relationship between these steps and those of claim 1 (PCT Guidelines, III, 4.1 and 4.4) has not been clearly established (PCT Article 6).
2. Some of the features in diagnostic kit claim 13 serve more to explain the way in which the device is used than to define the device clearly in terms of technical features. Therefore, contrary to the requirements of PCT Article 6, the restrictions intended by these features are not clear from said claim.
3. The expressions "such as" and "moreover" used in claims 13 and 15 are vague and equivocal and thus cast doubt on the meaning of the technical features to which they refer. Therefore, the subject matter of said claims has not been clearly defined (PCT Article 6 and the PCT Guidelines, III, 4.6).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 98/02320

VIII. Certain observations on the international application

4. The feature of claim 2 according to which T_m is of around 75-85 °C is not mentioned in the description. Therefore, claim 2 is not supported by the description (PCT Article 6).

The problems inherent in both types of approaches explain why PCR amplification has won such a widespread recognition.

5 In fact, this technique allows one to detect a rearrangement with a particular partner. However, in its current status, it can only detect the most frequent rearrangements and is not applicable to the whole partners because a very complex test would then be required and would use far too much material from the
10 patient.

A multiplex PCR technique was recently proposed to identify 4 to 6 partners, and even more. But this is still a sophisticated technique, becoming increasingly difficult as the number of partners to be tested grows,
15 and in addition, it requires a very expensive equipment (automatic sequencer with several fluorescent markers), so its use is restricted to a few expert laboratories

The solution contributed by the invention is based on the production of an anchored PCR, that is with
20 a single pair of primers, to indiscriminately amplify all types of fusion genes implicating the target gene and to specifically detect the fusion genes only. The whole body of fusion genes can be amplified and detected through a simple and fast protocol.

25 The purpose of the invention is thus to provide an in vitro diagnostic method of pathologies associated with gene rearrangements, to detect such rearrangements and applicable on virtually all patients.

REPLACED BY
ART 34 AMDT

CLAIMS

1/ In vitro diagnostic method of pathologies associated with gene rearrangement, characterized in that a patient's DNA is subjected to at least one step of anchored PCR, by performing at least one step of asymmetrical amplification, by means of a single pair of primers consisting in one DNA-specific primer of the gene liable to be involved in a fusion gene and one random primer, and in that such gene is only detected to the extent that its is involved in the said fusion, the whole present fusion partners being then revealed.

2/ A method according to claim 1, characterized in that the primers used in the amplification step include about 25 to 40 nucleotides, and particularly 30 to 35 nucleotides and T_m of about 75 to 85°C, particularly close to 80°C.

3/ A method according to claim 1 or 2, characterized in that nucleotide sequence-specific probes of known partners are put into contact with denatured PCR products, marked for detection in conditions consistent with a PCR products-probes specific interaction where base complementarity exists.

4/ A method according to claim 3, characterized in that detection is obtained either by PCR product marking with probes covalently secured on a support, or by probes marking in solution.

5/ A method according to any one of Claims 1 to 4, characterized in that the DNA subjected to

REPLACED BY
ART 34 AMDT

amplification is the cDNA as obtained by reverse transcription (RT) of the RNA extracted from the sample, or the total genome' DNA extracted from the sample under assessment.

5 6/ A method according to claim 5, characterized in that it includes a reverse transcription step before the amplification step.

10 7/ A method according to claim 6, characterized in that the primers used for reverse transcription are sequences including a cassette of about 40 to 60 nucleotides and 10 to 20 T patterns on one end or a random repeat of nucleotide pattern, or alternatively, multiple PCRs are used with different genes, marked with different markers from one another.

15 8/ A method according to any one of the Claims 1 to 7, characterized in that the genome DNA, or RNA, extracted from the sample cells under investigation, are subjected to the action of a compound with the capability of cleaving or inhibiting specifically the DNA or RNA of
20 the gene ,the fusion of which is under investigation and, after the PCR or RT-PCR step, with probes optionally including cloning sites, the products so obtained are allowed to react first with two specific probes of the gene under investigation and, more precisely, upstream
25 and downstream of the region liable to be concerned by the break point, and next, using probes prepared from known partner genes, where a positive detection on the upstream probe and a negative detection on downstream probe in the first case, evidencing a rearrangement of

REPLACED BY
ART 34 AMDT.

the relevant gene, and a negative detection in the second case evidencing that no known fusion product was detected or, alternatively, a plurality of probes are secured on a miniaturized support the probe/marked PCR products, specific hybridization highlighting the partner of the fusion gene.

9/ A method according to any one of the Claims 1 to 8, characterized in that it is applied to the detection of translocations involving the MLL gene, and includes RT synthesis of a cDNA pool from the RNA extracted from the sample under investigation, using primers which include a cassette of about 30 to 35 nucleotides complemented by a sequence of 6 or 9 random nucleotide patterns, and in that an anchored PCR is completed using a primer located on the MLL' exon 5 as specific sense primer, and on a second cycle, using an internal sense primer with respect to the first one, where the random primer is the same on each cycle and complements the oligonucleotide cassette used in the RT step.

10/ A method according to claim 9, characterized in that the detection of fusion transcripts, if any, includes putting :

- a specific probes of known MLL fusion partners, into contact with denatured PCR products marked by digoxigenine during amplification, in such conditions as will allow hybridization to occur where complementary bases are present,

- resulting products into contact with

REPLACED BY
ART 34 AMDT

anti-digoxigenine antibodies, such antibodies being coupled with an enzyme, capable of reacting with its substrate by releasing a colored product which can be detected if the antibodies should be bonded to PCR products, and then

- the probe/PCR product reactive mixture into contact with the enzyme substrate, and the product so formed if any, can be detected.

11/ A method according to claim 9 or 10, characterized in that to detect new MLL-partner gene associations, total RNAs are subjected to ribozymes action before RT-PCR, then the amplification products are allowed to react first with a probe corresponding to MLL exon 5 sequence on the 3' end of the primer used, then with a second MLL gene-specific probe located between the break points and ribozymes action site, and finally with known partner probes.

12/ Application of the method according to any one of the claims 1 to 11, to leukemia diagnostic.

13/ Application of the method according to any one of the claims 1 to 11, to solid tumor diagnostic, such as Ewing tumors.

14/ Diagnostic kits to implement the method according to any one of the claims 1 à 11, characterized in that such kits include the necessary reagents to perform the PCR and detection test, and as the case may be, the reverse transcription and/or reaction with agents capable of inhibiting or cleaving the gene, such as PNA or ribozymes, such kits further including primers for the

REFUGED BY
ART 34 AND 1

foregoing various reactions and, advantageously, the suitable solvents or buffers.

5 15/ Kits according to claim 14, characterized in that they include oligonucleotide probes to perform the hybridations at the detection step, such probes being secured on a support such as a multiwell plate, such as obtained by coupling a reagent on one of their ends with a reagent on the plate, for example by coupling biotin on their 5' end on streptavidine covering the bottom of a
10 micro plate wells, or alternatively, such oligonucleotide probes are secured on a miniaturized support, or according to still mother alternative, the internal probes are fixed on strips.

REPLACED BY
ART 34 AMDT